＊＊ 2011 年 12 月改訂 (第 5 版)
＊ 2010 年 2 月改訂 (第 4 版)

この使用説明書をよく読んでから使用してください

研究用試薬

Cotinine測定試薬

【はじめに】

たばこ煙中の成分であるニコチンは、口腔・気道・胃・腸管などの粘膜でも吸収されますが、肺胞においてその吸収量は最大であり、吸収されたニコチンは血液を介して体内に分布します。タバコ煙中の成分であるニコチンはその半減期が短く、生体内では主代謝産物であるコチニンに速やかに代謝され尿中に排泄されます。一方、コチニンの半減期は20時間と長く、血液、尿及び唾液などに存在します。このため、コチニンを喫煙マーカーとして利用した測定系が構築されています。

【全般的な注意】

1) 本製品は研究用試薬です。診療上の診断に用いることはできません。
2) 使用説明書に記載以外の使用方法については保証を致しません。
3) 使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用してください。詳細は機器メーカーにお問い合わせください。

【形状・構造等（キットの構成）】

1. 抗体固相化プレート：ウサギポリクローナル抗コチニン抗体
2. 酵素標識抗原液　：ペルオキシダーゼ結合コチニン
3. 標準溶液　：コチニン
   1) 標準溶液1 (　0 ng/mL)
   2) 標準溶液2 (　1 ng/mL)
   3) 標準溶液3 (2.5 ng/mL)
   4) 標準溶液4 (　5 ng/mL)
   5) 標準溶液5 (10 ng/mL)
   6) 標準溶液6 (25 ng/mL)
   7) 標準溶液7 (50 ng/mL)
   8) 標準溶液8 (100 ng/mL)
   9) 標準溶液9 (200 ng/mL)
4. 発色液　：3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（TMBZ)、尿素過酸化水素
5. 反応停止液　：0.5 mol/L 硫酸
6. Cotinine 用洗浄原液

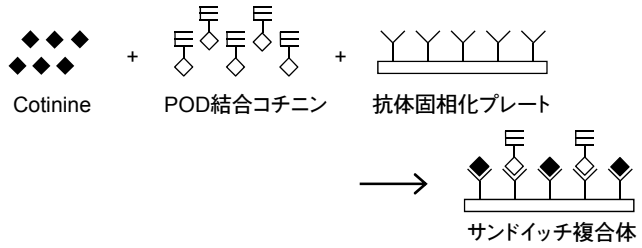
【使用目的】

唾液中のコチニンの測定

＊＊【測定原理】

1. 原理

本法は固相競合法に基づいています。
検体中の抗原 (Cotinine) 及びペルオキシダーゼ結合コチニンをマイクロプレートに固相化されているウサギポリクローナル抗コチニン抗体に反応させます。
固相に結合するペルオキシダーゼ (POD) の量は測定すべき抗原量に反比例するので、尿素過酸化水素 (H_2O_2) 及び3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMBZ) を基質として用い、遊離するTMBZ酸化物（発色体) を比色定量することにより、検体中のコチニン濃度を求めます。



H_2O_2 + TMBZ　POD　発色体

2. 特徴
   1) ニコチンとの交差反応性はほとんどありません。
   2) 最小検出感度は0.75 ng/mLと高感度です。
   3) 測定範囲が広く、200 ng/mLまで定量可能です。
   4) 唾液を検体としているため、非侵襲的に試料を採取できます。

＊＊【操作上の注意】

1. 測定試料の性質、採取方法
   1) 本製品による測定には、検体として唾液を使用してください。
   2) 新鮮な検体を使用してください。検体の保存が必要な場合は凍結保存し、凍結融解の繰り返しは避けてください。
   3) あらかじめ唾液から検体を抽出してください。唾液の採取・抽出には、Cotinine用 唾液採取器 (別売品)をご使用ください。
   唾液採取器を使用する場合は、操作法に従って唾液の採取・抽出を行ってください。

2. 妨害物質・妨害薬剤 [2)]
   1) 唾液採取時には血液の混入を避けてください。
   2) ニコチンとの交差反応性は0.6%、ニコチンアミド及びニコチン酸との交差反応性は0.0%です。

3. その他
   1) 検量線は測定毎に作成してください。
   2) 多検体を測定する場合は、各反応時間を定められた時間に統一するよう注意してください。

【用法・用量（操作法）】

1. 試薬の調製方法
   1) 洗浄液：
   精製水を用いて洗浄原液を5倍希釈してください。
   2) 上記以外の試薬：
   そのまま使用してください。

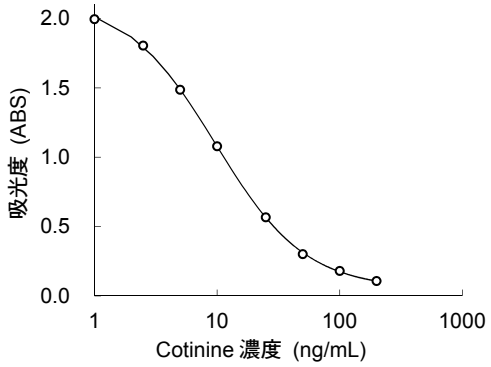
2. 必要な器具・器材・試料等
   1) 唾液採取器
   2) マイクロピペット、分注器
   3) プレートミキサー
   4) マイクロプレート用の汎用分光光度分析装置 (450 nm)

3. 測定法
   1) 標準溶液1～9及び検体を酵素標識抗原液で21倍希釈する。(例：標準溶液1～9及び検体10 μL、酵素標識抗原液200 μL)
   2) 抗体固相化プレートの各ウェルに希釈した標準溶液1～9及び検体を100 μLずつ加え、室温で1時間静置する。
   3) 反応液を除去した後、各ウェルに洗浄液を300 μLずつ加え、洗浄液を除去する。この操作を3回行った後、ペーパタオル上で叩くなどしてウェル内に残った水滴を完全に除去する。
   4) 各ウェルに発色液を100 μLずつ加え、室温で30分間遮光して静置する。
   5) 各ウェルに反応停止液を100 μずつL加え、軽く振とうさせ、10分以内に波長450 nmで吸光度を測定する。

**【測定結果の判定法】

1. 判定法
   コチニン濃度0～200 ng/mLの標準溶液（標準溶液1～9）より4-Parameter logisticsで検量線を作成し、検体の吸光度からコチニン濃度を読み取ってください。

2. 検量線例



3. 判定上の注意
   1) 検体の濃度が測定範囲を越える場合は、検体を標準溶液1で希釈して再測定してください。
   2) 検体により、検体中の目的成分以外の物質との反応や妨害反応を生じることがあります。測定値や測定結果に疑問がある場合は、再検査や希釈再検査、または他の検査方法により確認してください。

【性能】

1. 同時再現性
   同一検体を8回同時に測定するとき、測定値のC.V.値は10.0%以下です。
2. 測定範囲
   0.75～200 ng/mL

**【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上 (危険防止) の注意
   1) 唾液からの感染について安全性が確認されていませんので、感染の危険性があるものとして取扱いには十分注意してください。また、検体に接触した器具等は検体と同様、感染の危険性のあるものとして取扱ってください。
   2) 検査にあたっては感染の危険を避けるため使い捨て手袋を着用してください。
   3) 感染を避けるため、口によるピペッティングを行わないでください。
   4) 試薬が誤って眼や口に入った場合は、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当を受けてください。特に、反応停止液には0.5 mol/Lの硫酸、発色液には尿素過酸化水素が含有していますので、取扱いには注意してください。

2. 使用上の注意
   1) 本製品は凍結を避け、貯法に従い保存してください。誤って凍結させた試薬は、品質が変化して正しい結果が得られないことがあるので使用しないでください。
   2) 開封後の試薬は、蓋をしめて2～10℃で遮光保存してください。
   3) ラベルに記載されている使用期限内に使用してください。
   4) 本製品は正確な値が得られるように組み合せてあるので、異なるロットの構成試薬を組み合せて使用しないでください。使用後の残液は使用しないでください。

3. 廃棄上の注意
   1) 検体に接触した器具、試薬及び試薬容器等は感染の危険があるものとして処理してください。
   2) 使用後の容器を廃棄する場合は、貴施設の廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物又は産業廃棄物等を区別して処理してください。
   3) 本製品を廃棄する場合は、水質汚染防止法等の関連法規に従って処理してください。
   4) 本製品が漏出又は飛散した場合は、少量のときは吸水紙等で拭き取り、大量のときは水で洗い流してください。
   5) 本製品にはケーソンCGを防腐剤として含有しています。廃棄する場合は大量の水と共に流してください。

【貯蔵方法・有効期間】

貯蔵方法 ： 2～10℃ 遮光保存
有効期間 ： 12ヵ月 (使用期限は容器ラベル及び外箱に表示)

【包装単位】

製品名		管理コード	包装
Cotinine 測定試薬	抗体固相化プレート 酵素標識抗原液 標準溶液1 標準溶液2～9 発色液 反応停止液	PT-1000	96 well × 5 25 mL× 5 5 mL× 1 各1.0 mL× 1 30 mL× 2 30 mL× 2
Cotinine用 唾液採取器	試験管 試験管用付属キャップ 綿棒セット	PT-1100	1000本× 1 1000個× 1 1000個× 1
Cotinine用洗浄原液		PT-1200	1 L× 1

**【主要文献】

1) Neal L. Benowitz：Epidemiol. Rev., 18, 2：188-204 (1996)
2) 株式会社カイノス 社内データ

【問い合わせ先】

株式会社カイノス 学術部
〒113-0033 東京都文京区本郷2-38-18
☎ 03 (3816) 4480 FAX 03 (3816) 6544

製造販売元
株式会社カイノス
〒113-0033 東京都文京区本郷2-38-18 ☎ 03 (3816) 4485